DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.04.007
第25卷第4期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 4
294 2003年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)04-0294-04

IgY与双歧杆菌防治小鼠白色念珠菌感染的研究

常 山[1],查晓霞[2],陆 声[3],陈 军[1],张雅萍[1] (第三军医大学:[1]附属西南医院全军烧伤研究所,重庆 400038;[2]成都军医学院第47医院外二科,成都 610500;[3]成都军区昆明总医院,昆明 650000)

提 要:目的 观察特异性抗白色念珠菌鸡蛋黄抗体IgY和双歧杆菌的体内生物学效应,探讨将二者复合应用的可能性。方法 建立无特殊病原菌(Specific pathogen free,SPF)小鼠烧伤后口服白色念珠菌感染模型,应用活菌计数方法检测其回肠膜粘附白色念珠菌量、盲肠内容物白色念珠菌量以及白色念珠菌脏器移位率。结果 烧伤SPF小鼠喂服IgY和双歧杆菌后,均能明显抑制肠道内白色念珠菌生长和白色念珠菌粘附肠上皮细胞;二者复合应用后还能明显降低脏器白色念珠菌移位率。结论 特异性鸡蛋黄抗体IgY具有良好的体内生物学效应且优于单独使用双歧杆菌,二者复合应用效果最佳。

关键词:鸡蛋黄抗体;IgY;白色念珠菌;双歧杆菌
中图法分类号:R392.11;R379.1;R519.3 文献标识码:A

A study of the effects of IgY and *bifidobacterium* on the prevention and treatment of SPF-mice infection due to *Candida albicans*

CHANG Shan, ZHA Xiao-xia, LU Sheng, CHEN Jun, ZHANG Ya-ping (Institute of Burn Research, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the bio-activity of anti-*Candida albicans* egg yolk immunoglobulin Y (IgY) and *bifidobacterium* (*Bifo*) *in vivo* and to study the possibility of combined application of them. Methods The animal model with post-burn SPF (specific pathogen free)-mice infection was established by oral administration of *Candida albicans*. The quantity of *Candida albicans* existing in caecum and adhering to ileum mucosa and the translocation rate of *Candida albicans* in mouse viscera was analyzed by viable bacterial count. Results IgY and *Bifo* significantly inhibited both the growth of *Candida albicans* in the intestinal tract and its adhesion to intestinal mucosa in mice after they had been orally administered to post-burn SPF-mice respectively. In addition, the combination of IgY and *Bifo* could further decrease translocation rate of *Candida albicans* in murine viscera. Conclusion *Candida albicans* antibody IgY is of good biological effect against *Candida albicans in vivo* and is better than that of *Bifo* used independently, suggesting that the combined use of IgY and *Bifo* can result in ideal effect.

Key words: egg yolk antibody; IgY; *Candida albicans*; *bifidobacterium*

免疫鸡蛋黄中含有大量来源于血清的IgG抗体(又名IgY),其产量大,维持时间长,抗体提取方法成熟,对抗体活性影响小,且IgY具有高度耐酸、耐胃蛋白酶、耐热的稳定性,许多学者将其口服防治多种肠道感染性疾病并取得满意效果,已引起广大研究者的兴趣[1,2]。目前白色念珠菌的发病率呈逐年增高的趋势,众多的研究表明肠道白色念珠菌移位是白色念珠菌感染的主要来源,特别是在免疫力低下和广谱抗菌素应用后肠道菌群紊乱时更易发生[3,4]。本研究以烧伤无特殊病原菌(Specific pathogen free, SPF)小鼠肠源性白色念珠菌感染模型,应用制备的抗白色念珠菌IgY和双歧杆菌口服,提高肠道局部特异性免疫力和调节肠道菌群,观察其防治烧伤SPF小鼠肠源性白色念珠菌感染的生物效应,并探讨将二者复合应用的可能性。

1 材料和方法

1.1 抗白色念珠菌IgY抗体的制备与鉴定

白色念珠菌(CMCC44104)于0.4%福尔马林液中灭活后与等体积完全福氏佐剂混合乳化,皮下注射免疫25周龄Leghorn鸡,每两周加强1次,首次免疫后14 d收集鸡蛋备用。水溶法(WD)分离纯化IgY后(取蛋黄溶于9倍蒸馏水,离心取上清并用硫酸钠分步沉淀IgY)并透析、除菌干燥备用。紫外光双波长测定IgY含量,SDS-PAGE电泳检测提取IgY的纯度,细菌酶标

基金项目:重庆市科委院士基金(980010)
作者简介:常 山(1969-),男,重庆市人,硕士,主治医师,主要从事烧伤肠源性感染防治方面的研究,现在成都军医学院第47医院外二科,成都 610500。电话:(028)83016822, E-mail:zdfix@163.net
收稿日期:2002-04-22;修回日期:2002-09-27

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

染色观察 IgY 结合白色念珠菌的特异性。

1.2　双歧杆菌的制备[5]

青春型双歧杆菌(*Bifidobacyerium* adolescentis 0926, B. ado0926 由本室分离并经中国科学院微生物研究所鉴定), 常规培养提取后用生理盐水配成 1×10^{11} cfu/ml 备用。

1.3　实验动物鉴定及准备

SPF 昆明种小鼠(购于本校动物所), 体重约 25 g, 5~6 周龄, 雌雄不拘, 共计 186 只。实验前随机取 SPF 小鼠 5 只, 活杀后取回肠及其内容物约 0.2 g, 匀浆稀释后接种于沙氏固体选择培养基, 培养 72 h 后菌落行 G^- 染色和生化鉴定以明确是否有白色念珠菌生长。动物隔离饲养, 饲养环境严格消毒, 并给予消毒饲料和饮料, 定期检测饲养环境无菌情况。

1.4　动物模型制作

SPF 小鼠禁食 8 h 后, 依次喂入 0.2 ml 1% $NaHCO_3$、2×10^9 cfu/ml 的白色念珠菌悬液 0.5 ml, 立即 3% 凝固汽油致 25%TBSA Ⅲ度烧伤(病理切片证实), 伤后即腹腔注射生理盐水 1.5 ml/只, 创面碘伏消毒, 继续无菌饲养, 正常进食水。

1.5　实验动物分组

动物随机分为 5 组, A 组: 假伤组 10 只。B 组: 烧伤组 45 只, 按烧伤模型制作后每 6 h 口服生理盐水 0.5 ml。C 组: 烧伤 IgY 治疗组 42 只, 烧伤后每 6 h 灌胃 IgY 抗体 0.5 ml(50 mg/ml)/只。D 组: 烧伤双歧杆菌治疗组 42 只, 烧伤后每 6 h 灌胃双歧杆菌 0.5 ml(10^{11} cfu/ml)/只。E 组: 烧伤 IgY 双歧杆菌复合治疗组 42 只, 烧伤后每 6 h 灌胃 IgY 和双歧杆菌 0.5 ml/只(其中含 IgY 50 mg/ml, 双歧杆菌 10^{11} cfu/ml, 使用时现配。)。每组分 4 个时相点即: 伤后 6、12、24、48 h, 每时相点为 10~14 只动物不等。

1.6　检测指标及方法

1.6.1　脏器白色念珠菌定量检测　　无菌条件下分别在相应时相点取肝肾组织及肠系膜淋巴结组织, 匀浆稀释后取样接种于沙氏固体选择培养基, 37℃培养 72 h 计数阳性菌落并鉴定, 计算每克组织白色念珠菌含量 cfu/g 和阳性移位率。

1.6.2　回肠膜粘附白色念珠菌定量检测　　在相应时相点分别取末端回肠长约 8 cm, 0.01 mol/L pH 7.4 PBS 10 ml 分 3 次冲洗肠腔至肠腔呈半透明状, 匀浆稀释后取样接种, 37℃培养 72 h 计数阳性菌落并鉴定, 计算 cfu/g。

1.6.3　盲肠内容物白色念珠菌定量检测　　在相应时相点分别取盲肠内容物匀浆稀释后取样接种, 37℃培养 72 h 计数阳性菌落并鉴定, 计算 cfu/g。

1.6.4　组织病理学观察　　于烧伤后 12 h 分别取各组回肠组织, 无菌 0.01 mol pH 7.2 PBS 冲洗干净肠腔后分别用 4% 多聚甲醛液固定并石蜡包埋行常规 HE 染色, 光镜观察粘膜损害程度; 3% 的戊二醛固定, 透射电镜观察微绒毛损害程度。

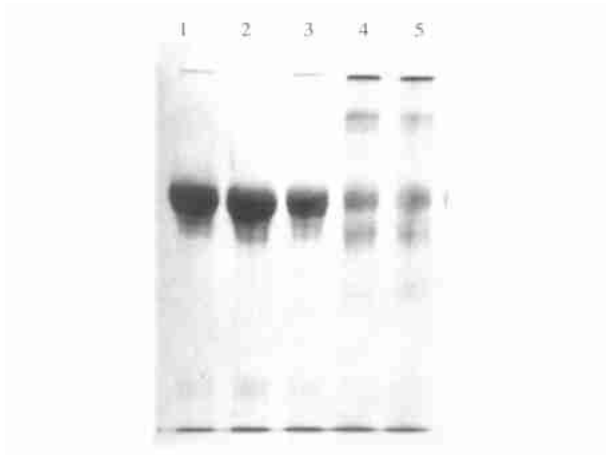
1.7　统计学分析

实验数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 分别行 t 检验和 χ^2 检验。

2　结果

2.1　IgY 抗体特异性、含量和纯度

抗白色念珠菌 IgY 对该菌染色阳性而对绿脓杆菌, 葡萄球菌染色阴性。提取物 IgY 含量平均为 13.7 mg/ml 蛋黄液。SDS-PAGE 电泳凝胶扫描, 检测 180×10^3 带(IgY)所占百分比, 得出纯化后 IgY 纯度高达 95%, 见图 1。



1, 2: Chicken serum; 3~5: Purified IgY

图 1　纯化 IgY 和鸡血清的 SDS-PAGE 电泳图

Fig 1　SDS-PAGE electrophorograms of purified IgY and chicken serum

2.2　动物鉴定

5 只 SPF 小鼠沙氏培养结果均阴性, 说明该昆明种 SPF 小鼠合格, 适宜制作白色念珠菌肠源性感染模型。

2.3　白色念珠菌脏器移位率、回肠膜粘附量及盲肠内容物含量

烧伤后 6 h 即出现白色念珠菌移位, 移位率高峰在伤后 12 h, 高达 64%。肠道内白色念珠菌量和肠粘膜粘附白色念珠菌量在伤后 6 h 为最高峰, 随时间延长逐渐降低。应用 IgY、双歧杆菌及二者复合治疗后均可抑制肠腔白色念珠菌生长和白色念珠菌粘附肠上皮细胞, IgY 治疗后各时相点肠腔菌量和粘附菌量为治疗前 30% 左右, 双歧杆菌治疗后早期肠腔菌量和粘附菌量为治疗前 50%~60% 左右, 复合治疗后各时相点肠腔菌量和粘附菌量不足治疗前 20%, 见表 1、2。3 种治疗中只有复合治疗组显著降低了白色念珠菌的脏器移位率($P<0.05$), 见表 3。

表 1　SPF 小鼠肠腔白色念珠菌含量($\times 10^5$ cfu/g　$\bar{x}\pm s$)

Tab 1　The quantity of Candida albicans in caecum in SPF mice ($\times 10^5$ cfu/g, $\bar{x}\pm s$)

	6 h	12 h	24 h	48 h
Burns	1.945±1.399	1.478±0.409	0.758±0.507	0.521±0.459
Bifo. (10^{11} cfu/6 h)	0.707±0.278 **	0.754±0.251 **	0.412±0.191 **	0.326±0.311
IgY (25 mg/6 h)	0.498±0.229 **#	0.487±0.328 **#	0.273±0.191 **#	0.147±0.077 *#
Combination	0.377±0.195 **	0.210±0.186 **★	0.147±0.140 **★	0.119±0.033 **

*: $P<0.05$　**: $P<0.01$ *vs* Burns;　#: $P<0.05$ *vs* Bifo;　★: $P<0.05$ *vs* IgY

表 2　SPF 小鼠肠粘膜白色念珠菌粘附量(cfu/g　$\bar{x}\pm s$)

Tab 2　The quantities of Candida Albicans adhered to ileum mucosa (cfu/g, $\bar{x}\pm s$)

	6 h	12 h	24 h	48 h
Burns	9 206±7 917	7 908±1 878	5 779±3 231	1 724±1 485
Bifo. (10^{11} cfu/6 h)	5 184±2 475 *	4 968±1 260 *	3 725±2 984	1 642±955
IgY (25 mg/6 h)	2 668±1 315 **#	2 423±1 288 **#	2 354±1 945 **#	995±436 #
Combination	1 546±1 287 **★	1 267±677 **★	1 200±497 **★	1 086±498

*: $P<0.05$ *vs* Burns;　#: $P<0.05$ *vs* Bifo;　★: $P<0.05$ *vs* IgY

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表 3 SPF 小鼠脏器白色念珠菌移位率(*n* 为总例数)

Tab 3 The bacteria translocational rates of SPF mice (*n*: total)

	6 h			12 h			24 h			48 h		
	n	positive(*n*)	rates(%)	*n*	positive(*n*)	rates(%)	*n*	positive(*n*)	rates(%)	*n*	positive(*n*)	rates(%)
Burns	10	6	60	11	7	64	14	7	50	10	3	30
Bifo. (10^{11} cfu/6 h)	10	5	50	11	5	45	11	2	18	10	2	20
IgY(25 mg/6 h)	11	4	36	11	3	27	10	2	20	10	1	10
Combination	11	2	18 *	11	2	18 *	10	1	10 *	10	0	0

*: $P<0.05$ *vs* Burns

2.4 组织病理学观察

烧伤后 12 h 光镜可见粘膜结构基本消失,仅留粘膜下层和肌层,见图 2。电镜可见肠上皮细胞微绒毛排列稀疏、脱落,细胞水肿、结构破坏。复合组治疗后 12 h 光镜见粘膜结构明显好转,但粘膜高度降低、稀疏,见图 3。电镜可见肠上皮细胞微绒毛恢复较明显,结构基本正常,但细胞水肿仍然存在。

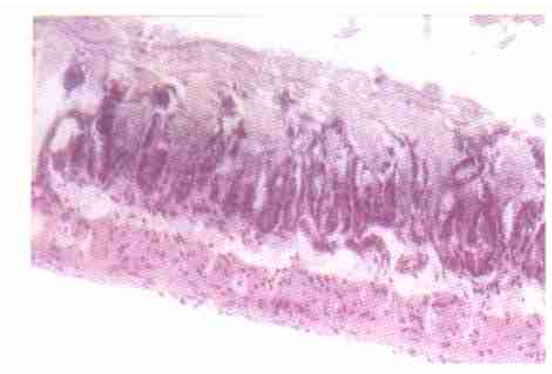


图 2 烧伤后 **12 h** 肠粘膜损害 (HE× 100)

Fig 2 Damage of intestinal mucosa at 12 h post burn (HE× 100)



图 3 复合治疗后 **12 h** 肠粘膜改变 (HE× 400)

Fig 3 Change of intestinal mucosa after compound treatment at 12 h post burn (HE× 400)

3 讨论

肠源性感染主要与 3 个方面有关:肠道机械屏障破坏、主要是烧伤后缺血缺氧造成肠道粘膜坏死。肠道生物屏障破坏、主要是应用广谱抗生素引起肠道菌群紊乱和肠道定植抗力的降低。肠道免疫屏障破坏、主要是肠道局部免疫力下降[3]。基于上述发病原因我们采用了 3 种治疗手段:恢复肠道生物屏障的双歧杆菌、被动提高肠道局部免疫力的抗白色念珠菌 IgY 抗体、双歧杆菌和 IgY 复合应用。双歧杆菌能定植于肠道粘膜提高其非特异性定植抗力,已证明在对抗肠源性细菌移位上有重要作用[5];IgY 对病原体有良好的拮抗作用并已有口服治疗感染性腹泻的报道,可提高肠道粘膜局部特异性免疫力[6];同时将二者复合应用,比较 3 种治疗效果。

从结果看免疫制备的抗白色念珠菌 IgY 抗体产量大(13.7 mg/ml 蛋黄液),纯度高(95%),具有良好的特异性。烧伤 SPF 小鼠肠源性白色念珠菌感染模型稳定可靠,烧伤后 6 h 即出现白色念珠菌移位。双歧杆菌组在 24 h 前显著抑制了肠腔白色念珠菌生长量($P<0.01$),单一 IgY 治疗和复合治疗在各时项点均显著抑制了肠腔白色念珠菌生长量($P<0.01$),且单一 IgY 治疗在各时相点均优于单一双歧杆菌治疗,但复合治疗又优于单一 IgY 治疗、效果最佳。单一双歧杆菌治疗早期显著抑制了白色念珠菌对肠上皮的粘附($P<0.05$),但后期效果不明显($P>0.05$),而单用 IgY 治疗和复合治疗均明显抑制了白色念珠菌的粘附($P<0.01$),且单一 IgY 治疗在各时相点均优于单一双歧杆菌治疗,复合治疗后粘附量不足非治疗组的 20%,远低于其它两个治疗组,效果明显优于单一 IgY 治疗效果最佳。3 种治疗手段中只有复合治疗组显著降低了白色念珠菌的脏器移位率($P<0.05$)。

从以上结果可以看出:单用 IgY 治疗效果好于单用双歧杆菌治疗,但均不及复合治疗效果好。复合应用 IgY 和双歧杆菌,既提高了肠道特异性的局部免疫力,减少白色念珠菌粘附和破坏肠上皮细胞,恢复免疫屏障;同时又调理肠道菌群、建立生态屏障、提高肠道非特异性的定植抗力;因而在降低肠腔白色念珠菌量和肠粘膜粘附白色念珠菌量,特别是降低烧伤后白色念珠菌的肠源性移位上效果十分明显,优于应用任何单一治疗组。从肠粘膜组织形态学观察也发现,复合治疗对肠粘膜和微绒毛结构均具有明显保护作用。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

近年来 IgY 抗体因其巨大产量、高度稳定性而被受研究者青睐, 正广泛用于诊断试剂和治疗药物, 特别是应用于防治肠道病原体如轮状病毒取得了良好效果[7]。我们首次制备出高纯度抗白色念珠菌 IgY 抗体, 发现其产量高, 稳定性极好, 具有很好的抗白色念珠菌体内生物学效应, 特别是将其与双歧杆菌复合应用后效果明显增强, 作为口服药物或食品添加剂防治肠道白色念珠菌感染将具有广阔的前景。

参考文献:

[1] 常　山, 张雅萍. 鸡卵黄免疫球蛋白抗体 IgY 研究进展[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(6): 19－22.

[2] Akita E M, Nakai S. Comparision of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic *E. coli* strain[J]. J Immunol Methods, 1993, 160(2): 207－214.

[3] 张雅萍. 严重烧伤后肠粘液成份的改变及其与肠源性感染的关系[J]. 中华整形烧伤外科学杂志, 1996, 12(2): 90－92.

[4] Casadevall A. Antibody immunity and invasive fungal infection[J]. Infect Immun, 1995, 63(11), 4211－4218.

[5] Zhang Y P. A preliminaryclincial study of Bifidobacteria preparation on the treatment of diarrhea in severely burned patients[J]. Chin Med J, 1998, 111(4): 381－382.

[6] 常　山, 张雅萍, 肖光夏. 抗白色念珠菌 IgY 的稳定性及应用研究[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(12): 1390－1392.

[7] Sugita Konishi Y, Shibata K, Yun S S. Immune functions of immunoglobulin Y isolated from egg yolk of hens immunized with various infectious bacteria[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 1996, 60(5): 886－888.

（编辑　郭建秀）

（上接 293 页）

膜下 3 例, 额叶 3 例, 蛛网膜下腔 3 例, 小脑内 1 例, 丘脑 1 例, 额颞 1 例, 颞叶 1 例, 多发性软化灶 1 例。

4　治疗与转归

根据出血原因, 给予止血剂、输新鲜血、并给予脱水、镇静、止惊、预防感染、维生素 K 等综合治疗。结果治愈 8 例, 自动出院 1 例, 死亡 1 例。

5　护理

5.1　一般护理

对于早产儿颅内出血应将患儿置于暖箱内, 保持体温在 36～37 ℃, 婴幼儿患者应保持室温 24～26 ℃, 相对湿度在 55%～65%, 有条件者婴幼儿应给予单独房间, 避免噪音过大, 引起患儿抽搐, 加重出血。认真观察生命体征的变化。

5.2　加强呼吸道的管理

在对患儿进行各种护理操作时, 护理人员工作中应有条理性, 操作应集中进行, 减少对患儿过多的刺激, 以免加重颅内出血。对烦躁不安, 反复抽搐者, 应抬高上半身 15°～30°以减轻颅内压, 同时, 保持呼吸道通畅, 准备好气管插管、呼吸机、急救药物等。对缺氧者应及时吸氧。

5.3　认真观察病情变化

5.3.1　意识观察　　患儿的意识是否清楚, 瞳孔的大小、对光反射是否存在, 有无颅性尖叫, 抽搐、双眼凝视、嗜睡、昏迷等神经症状和体征。

5.3.2　缺氧情况的观察　　出血量多, 重症颅内出血的患儿缺氧症状明显。由于颅压增高, 压迫呼吸中枢, 表现为颜面苍白、口周青紫、呼吸不规则或出现呼吸暂停现象, 新生儿应给与面罩给氧, 1～1.5 L/min, 幼儿可给与鼻导管吸氧, 2～3 L/min, 均应早期发现, 早期处理, 如脱水剂、呼吸兴奋剂、止血剂、给氧等均要及时应用。

5.4　降低颅压

降颅压只适用较危重的患儿。经治疗抽搐不改善, 而病情进行性加重者, 新生儿应给予 20%甘露醇每次 0.25～0.5 g/kg, 30 min 内滴入, 速尿每次 0.5～1 mg/kg, 肌注或静脉推注。婴幼儿 20%甘露醇每次 0.5～1.0 g/kg, 30 min 内滴入。观察患儿面色有无青紫, 呼吸急促, 前囟紧张或者隆起等表现。

5.5　镇静

如有烦躁不安、尖叫、反复抽搐者, 按医嘱给与镇静剂, 新生儿给予安定 0.1～0.3 mg/kg、鲁米那 3～5 mg/kg, 婴幼儿给予安定 0.1～0.5 mg/kg、鲁米那 5～8 mg/kg 静脉缓注、口服或者灌肠, 要记录用药时间, 用药剂量及用药效果。

5.6　饮食护理

病情较轻者在症状好转后可直接喂养, 病情较重者, 鼻饲喂养, 保持营养和水分的摄入, 鼻饲前证实胃管是否在胃内, 以防注入呼吸道引起窒息。

5.7　预防感染

颅内出血的患儿抵抗力低易并发感染, 应积极防护。各项操作注意执行隔离、消毒、无菌技术等制度, 每护理一个患儿均应严格洗手, 加强皮肤、口腔等护理, 一旦发现感染征象, 及时处理。

5.8　出院指导

对于平时体健纯母乳喂养的婴儿, 突发精神差, 拒乳、尖叫等表现, 应警惕是否有晚发性维生素 K 缺乏而引起颅内出血。本组 1 例母乳喂养 3 月未添加辅食引起发病, 经维生素 K 及时治疗获满意疗效。多数学者认为, 母乳喂养是造成维生素 K 缺乏的主要因素, 因母乳中维生素 K 含量很少, 仅为同等量鲜牛乳的 1/4, 故母乳喂养可影响维生素 K 的摄入量。也有报道, 母乳喂养者肠道内细菌产生维生素 K 少[1], 应及时补充维生素 K 以预防晚发性维生素 K 缺乏, 为此对小婴儿要注意询问喂养史, 并全面检查全身有无其它部位出血, 年龄较大的幼儿应加强安全防护, 以免外伤引起颅内出血。

关键词: 婴幼儿; 颅内出血; 护理
中图法分类号: R473.72; R722.151　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 王墨芝, 王福玲. 小儿颅内出血 52 例临床分析[J]. 滨洲医学院学报, 1999, 4(22): 378.

（编辑　张　宁）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net